

ICS 01.040.65

CCS B 04

TB

团体标准

T/ NAIA××××~××××

牛乳头瘤病诊断技术规程

Technical protocol for the diagnosis of bovine papillomatosis

征求意见稿

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农林科学院动物科学研究所、固原市职业技术学校、同心县科技局、吉林农业大学、固原市畜牧技术推广服务中心、银川市畜牧技术推广服务中心、海原县农业农村局、平罗县农业农村局。

本文件主要起草人：郭亚男、王建东、王鑫、岳康、梁小军、宗亮泽、李喬、马科、牛晓昊、邵喜成、王学义、王嘉凡、于有利、张久盘、王小龙、曹晓真。

本文件为首次发布。

牛乳头瘤病诊断技术规程

1 范围

本文件规定了牛乳头瘤病诊断技术的术语和定义、牛乳头瘤病临床诊断、样品采集及保存、分子生物学诊断、病理组织学观察。

本文件适用于牛养殖户、规模化牛场对牛乳头瘤病的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

T/WHAS 030-2022 常规病理标本HE制片染色规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

牛乳头状瘤 Bovine Papillomas

是由牛乳头瘤病毒（Bovine Papillomavirus, BPV）引起的一种常见疾病，主要影响牛的皮肤和黏膜，导致良性肿瘤的形成。

4 临床诊断

4.1 临床症状

牛乳头状瘤主要集中在患病牛的头颈部，另外颈部、胸腹部等皮肤部均有乳头状瘤发生，颜色多呈灰白色或褐色。瘤体表面粗糙呈菜花状、结节状外观，质地较为坚硬，容易破溃出血，切开瘤体后有乌黑色污浊液体从瘤体中央流出。通常几个瘤在一起生长，有时连成一片，瘤体直径约 0.5-8 cm。

4.2 结果判定

出现 4.1 中的情况，初步判定为牛乳头状瘤病，需要进一步开展实验室诊断。

5 样品采集及保存

采用 75 %医用酒精对肿瘤及外周进行消毒，然后采用外科手术摘除感染牛皮肤表面瘤体，采集的乳头状瘤样本放在 50 %甘油生理盐水溶液中，低温保存运输送至实验室保存。

6 分子生物学诊断

6.1 主要试剂及主要仪器

6.1.1 主要试剂

D2000 Marker、2×Taq PCR Master Mix、血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒。

6.1.2 主要器材

电泳仪、凝胶成像仪、PCR 仪。

6.2 引物合成

基于 NCBI 上公布的乳头状瘤病毒 L1 基因序列，由生物公司合成引物 P1：5'-ATGGCGTTGTGGCAACAAG-3'，P2：5'-TTAAGCTTTGATTTTTTTC-3'，产物长度 1494bp。

6.3 DNA 的提取方法

将样品置于超净工作台中室温解冻，取 200 mg 的动物组织加入约 3 倍体积的生理盐水进行匀浆，充分匀浆后 10 000 r/min 离心 2 min 去除残余组织。取 300 μ l 上清液至新的洁净离心管中。然后参照“血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒”说明书操作提取乳头样肿瘤组织基因组 DNA,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

6.4 PCR 扩增

采用合成引物对 DNA 组进行扩增，反应体系为 50 μ L 体系：DNA 模板 2 μ L，上下游引物各 1 μ L（20 μ mol/L），2×Taq Master Mix 25 μ L，ddH₂O 21 μ L。引物反应条件为：预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min；变性 95 $^{\circ}$ C 30 s，退火 53 $^{\circ}$ C 20 s，延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 终延伸 8 min。

6.5 PCR 产物测序

按照上述程序对样品 DNA 提取物进行 PCR 扩增，产物经 1 %琼脂糖凝胶电泳分析后，用凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物，将 PCR 纯化产物送生物公司测序。

6.6 PCR 产物序列比对及分子进化分析

扩增序列遗传进化分析采用 SeqMan Pro 软件对扩增产物测序结果进行拼接，然后通过 NCBI 网站的 BLAST 程序进行相似性比对；对对比的序列从 NCBI 下载并整理后采用 MEGA 软件中的邻接法构建系统

进化树，进行遗传进化分析。

6.7 结果判定

在阳性对照出现相应扩增带、阴性对照无此扩增带时判定结果。出现预期大小的扩增片段时,判定为检测阳性,否则判定为阴性。若为阳性，则需进一步测序比对，通过比对结果，验证 PCR 产物的正确性。最后进行遗传进化分析，获取毒株之间亲缘关系。

7 病理组织学观察

7.1 主要器材

转轮式切片机、自动组织脱水机、包埋机、全自动染色机、病理组织漂烘仪、数字切片扫描仪。

7.2 切片制作并观察

病理标本 HE 制片染色按照 T/WHAS 030-2022 执行。染色结束后采用数字切片扫描仪对切片进行图像采集，并观察具体病变。

7.3 结果判定

若病理组织切片中出现以下现象则可确诊为乳头状瘤：角质层增厚，局部可见角化不全；表皮层棘层肥厚，皮突延长，表皮上部多见上皮细胞胞质空泡化，局部可见上皮细胞点状坏死，核碎裂或溶解；真皮层可见少量淋巴细胞与中性粒细胞浸润，局部可见毛细血管扩张。